

Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode *in vitro*

(Callus Induction of Calamansi (*Citrus microcarpa*) Using 2,4-D and BAP Hormones by *in vitro* Methods)

Imam Mahadi*, Wan Syafi'i, Yeni Sari

(Diterima Maret 2016/Disetujui Agustus 2016)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian hormon 2,4-D dan *benzyl amino purin* (BAP) terhadap pertumbuhan kalus jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*). Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial. Parameter yang diamati adalah persentase tumbuh eksplan, waktu muncul, lebar, dan tekstur kalus. Hasil penelitian persentase tumbuh eksplan dan lebar kalus dianalisis dengan ANOVA dan uji lanjut DMRT pada taraf 5%, sedangkan waktu muncul kalus dan tekstur kalus dilakukan secara deskriptif. Hasil Penelitian menunjukkan bahwa kombinasi hormon D₄B₁ dan D₄B₂ menghasilkan waktu muncul kalus tercepat, yaitu 3,3 HSK. Persentase pembentukan kalus tertinggi, yaitu 100% terdapat pada perlakuan D₂B₀, D₂B_{0.5}-D₄B₀. Rerata lebar kalus tertinggi terjadi pada perlakuan D₄B₂ dengan lebar kalus 0,97 cm. Kalus embriogenik dihasilkan pada perlakuan D₂B₁, D₂B₂, dan D₃B₀. Perlakuan Kombinasi hormon 2,4-D dan BAP yang terbaik adalah pada perlakuan D₂B₂ (2 mg/l 2,4-D, dan 2 mg/l BAP) untuk menghasilkan kalus embriogenik sehingga dapat digunakan untuk kultur suspensi sel.

Kata kunci: BAP, eksplan jeruk kasturi, hormon 2,4-D, kalus embriogenik

ABSTRACT

Calamansi fruits (*Citrus microcarpa*) or musk lime is one horticulture crops has been known as beverage and food flavorings. This research aimed to determine the effect of 2,4-D and BAP on callus induction of explants calamansi fruits (*Citrus microcarpa*). Parameters observed is percentage of explants, time appeared callus, callus width, and texture of the callus. Research results and a growing percentage of the width callus explants were analyzed by ANOVA and a further test DMRT at 5% level. The next to appear callus timing parameters and texture of callus analyzed in description. The result shows that a combination of hormones D₄B₁ and D₄B₂ produces a callus emerged fastest of 3.3 days after culture. The highest percentage of callus formation that is 100% contained in the treatment of D₂B₀, D₂B_{0.5}-D₄B₀. The mean width of callus was highest in treatment D₄B₂ with a width of 0.97 cm. Embryogenic callus resulting by treatment of D₂B₁, D₂B₂, and D₃B₀. However, the best a combination of hormones is treatment D₂B₂ (2 mg/l, 2,4-D, dan 2 mg/l BAP) producing embryogenic callus advanced to suspension cultures.

Keywords: BAP, callus embryogenic, explant calamansi, hormone 2,4-D

PENDAHULUAN

Jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) adalah salah satu spesies dari genus citrus yang memiliki kandungan vitamin C, juga anti oksidan yang tinggi. Selain itu, Jeruk kasturi memiliki komponen penyusun dari berbagai senyawa kimia hasil metabolit sekunder antara lain asam sitrat, asam amino, dan minyak atsiri (Bal 1997). Seiring dengan kebutuhannya yang semakin tinggi, sintesis senyawa minyak atsiri secara alami belum mencukupi kebutuhan masyarakat karena produksinya masih sangat rendah. Sementara itu, lahan dan plasma nutfah semakin menyusut, sehingga diperlukan alternatif pemecahan. Untuk memenuhi kebutuhan bahan metabolit sekunder tersebut dapat digunakan kultur suspensi sel. Untuk mendapatkan

Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Riau, Jl Binawidya KM.12,5 Pekanbaru.

* Penulis Korespondensi: E-mail: i_mahadi@yahoo.com

sel yang bersifat embriogenik, remah, dan mudah terurai perlu dilakukan kajian kultur kalus. Kalus adalah kumpulan sel tanaman yang belum berdiferensiasi (Hartman & Kester 1983). Untuk mendapatkan kalus embriogenik perlu kajian induksi kalus dengan penambahan hormon pada media tumbuh secara *in vitro*.

Menurut Gunawan (1992), kultur jaringan atau metode *in vitro* merupakan suatu teknik memilih galur tanaman dan menghasilkan individu baru yang bersih dari hama dan penyakit, dengan jumlah yang banyak dengan waktu yang singkat. Kultur jaringan dilakukan secara *in vitro*, yaitu bagian jaringan yang dibiakkan berada di dalam tabung atau botol kaca atau material tembus pandang yang lain. Keberhasilan kultur jaringan juga tidak lepas dari pengaruh zat pengatur tumbuh (ZPT) atau hormon yang diberikan. Keberhasilan pelaksanaan kultur jaringan antara lain ditentukan oleh penggunaan komposisi media yang sesuai.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi hormon 2,4-D dan BAP untuk merangsang pembentukan kalus yang bersifat embriogenik, remah, dan mudah terurai sehingga dapat digunakan untuk bahan dasar kultur suspensi sel yang sesuai. Selanjutnya pemilihan kalus untuk diperbanyak dalam kultur suspensi sel. Teknik ini dapat menghasilkan bahan metabolit sekunder dalam jaringan tanaman yang diperoleh melalui kalus. Metabolit yang dihasilkan dari kalus sering kali kadarnya lebih tinggi daripada metabolit yang diambil langsung dari tanamannya.

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk dapat menginduksi dan meningkatkan pertumbuhan kalus adalah dengan penambahan hormon pada media kultur (Rahmi *et al.* 2010). Menurut Mahadi *et al.* (2014), salah satu hormon yang sering digunakan dan sangat efektif adalah 2,4-D, yaitu auksin yang dapat merangsang pembentukan sel-sel. Konsentrasi yang rendah <5 mg/l hormon 2,4-D pada tanaman dikotil dapat merangsang induksi kalus. Untuk kelompok sitokinin biasanya menggunakan *benzyl amino purin* (BAP) yang berfungsi menstimulasi pembelahan sel dalam jumlah yang sangat kecil <1 mg/l. Penelitian ini untuk mengetahui tentang pengaruh pemberian hormon 2,4-D dan BAP terhadap pertumbuhan kalus jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*). Dengan demikian, kajian ini adalah untuk mengetahui apakah penggunaan kombinasi hormon 2,4-D dan BAP pada media *in vitro* pada eksplan jeruk kasturi dapat menginduksi kalus dan menghasilkan kalus yang bersifat embriogenik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan bahan biji jeruk kasturi

varietas kalamansi FR yang berasal dari Bengkulu. Medium Murashige dan Skoog (MS), hormon 2,4-Dikloropenoksi asetik (2,4-D), 6-*benzyl amino purin* (BAP), alkohol 70 dan 96%, NaOH 0,1 N, HCl 0,1 N, agar Bacto Facto, Tween 20, Makro dan Mikro nutrisi, EDTA, Myoinositol, dan bahan-bahan pendukung lainnya.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial yang faktor pertama adalah 2,4-D dengan taraf perlakuan, yaitu 0; 0,5; 1; dan 2 mg/l. Faktor kedua adalah BAP dengan taraf perlakuan, yaitu 0, 1, 2, 3, dan 4 mg/l. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Parameter yang diamati adalah persentase tumbuh eksplan, saat muncul, lebar, dan tekstur kalus. Hasil penelitian persentase tumbuh eksplan, dan lebar kalus dianalisis dengan ANOVA dan uji lanjut DMRT pada taraf 5%, sedangkan saat muncul kalus dan tekstur kalus dilakukan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh pemberian hormon 2,4-D dan BAP terhadap induksi dan pertumbuhan kalus tanaman jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) didapatkan data seperti pada Tabel 1.

Waktu Muncul Kalus

Hasil pengamatan waktu muncul kalus pada Tabel 1 menunjukkan bahwa pemberian kombinasi hormon 2,4-D dan BAP secara deskripsi dari angka yang diperoleh adalah berpengaruh. Pada perlakuan D₄B_{0,5} dan D₄B₁ merupakan rerata waktu muncul kalus yang paling cepat, yaitu 3,33 HSK. Semakin tinggi kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam medium menyebabkan laju per-

Tabel 1 Rerata pengaruh pemberian hormon 2,4-D dan BAP terhadap pertumbuhan kalus tanaman jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*)

Kombinasi 2,4-D dan BAP (mg/l)	Rerata waktu muncul kalus (HSK)	Rerata presentase jumlah kalus yang terbentuk (%)	Rerata lebar kalus (cm)
D ₀ B ₀	12	16,67 d	0,40 e
D ₀ B _{0,5}	12,33	25 c	0,37 d
D ₀ B ₁	12,33	25 c	0,37 d
D ₀ B ₂	12,67	33,33 c	0,30 d
D ₁ B ₀	7,33	58,33 b	0,60 c
D ₁ B _{0,5}	7,67	66,67 b	0,63 c
D ₁ B ₁	8	75 b	0,67 c
D ₁ B ₂	8,67	83,33 b	0,63 c
D ₂ B ₀	6,33	100 a	0,67 c
D ₂ B _{0,5}	6	100 a	0,73 b
D ₂ B ₁	6	100 a	0,77 b
D ₂ B ₂	6,67	100 a	0,70 b
D ₃ B ₀	5,67	100 a	0,73 b
D ₃ B _{0,5}	5,33	100 a	0,80 a
D ₃ B ₁	5	100 a	0,83 a
D ₃ B ₂	4,67	100 a	0,87 a
D ₄ B ₀	4	100 a	0,87 a
D ₄ B _{0,5}	3,67	100 a	0,90 a
D ₄ B ₁	3,33	100 a	0,93 a
D ₄ B ₂	3,33	100 a	0,97 a

Keterangan: hari setelah kultur (HSK).

tumbuhan kalus semakin tinggi, hal ini sesuai menurut Robles-Martinez *et al.* (2016) penggunaan auksin 2,4-D dapat memacu pertumbuhan kalus, auksin berupa 2,4-D dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas, dan pengembangan dinding sel.

Pada induksi kalus jeruk kasturi ini terjadi plastisitas dan pengembangan dinding sel didorong oleh pemberian auksin, karena auksin mengeluarkan H^+ ke dalam dinding sel dan H^+ ini menyebabkan pH dinding sel menurun sehingga terjadi pelonggaran struktur dinding (berarti peningkatan plastisitas) dan terjadi pertumbuhan. Penambahan sitokinin dalam media sangat dibutuhkan untuk meningkatkan pembelahan sel, karena sitokinin berperan dalam pembentukan benang gelendong pada tahap metafase. Perbedaan laju pertumbuhan kalus selain dipengaruhi oleh peningkatan kecepatan pembelahan sel karena pengaruh pemberian 2,4-D dan BAP juga dipengaruhi oleh kondisi genetis, umur jaringan, dan jenis tanaman serta faktor lingkungan yang meliputi cahaya, kandungan O_2 , suhu, dan kelembapan udara serta kemampuan jaringan untuk menyerap zat-zat hara yang tersedia, hal ini banyak dipengaruhi oleh aerasi pada media dan tekstur kalus yang dihasilkan.

Menurut Samudin (2009), menyatakan bahwa dalam aktivitas kultur jaringan, terutama hormon auksin sangat dikenal sebagai hormon yang mampu berperan menginduksi terjadinya kalus. Pada konsentrasi rendah akan memacu akar adventif, sedangkan pada konsentrasi tinggi mendorong terbentuknya kalus. Pada perlakuan $D_4B_{0,5}$ dan D_4B_1 merupakan kombinasi antara hormon auksin dan sitokinin yang terbaik untuk merangsang pembentukan kalus sehingga menghasilkan rerata waktu muncul kalus yang paling cepat, yaitu 3,33 HSK.

Persentase Jumlah Kalus

Persentase tumbuh eksplan dari hasil analisis varian menunjukkan bahwa pemberian hormon 2,4-D dan BAP berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan eksplan. Hal ini disebabkan karena hormon endogen yang ada di dalam eksplan sudah mencukupi untuk pertumbuhan eksplan jeruk kasturi dan ditambah lagi dengan hormon eksogen yang dapat merangsang pertumbuhan eksplan dengan cepat. Dari Tabel 1 terlihat bahwa hampir semua perlakuan, yaitu D_2B_0 - D_4B_2 menunjukkan persentase tumbuh eksplan mencapai 100%, hal ini disebabkan karena eksplan yang digunakan adalah jaringan muda yang memiliki sifat maristematik yang memiliki hormon endogen yang aktif membelah dan kemudian dikombinasikan dengan hormon eksogen dari kelompok auksin (2,4-D) dan sitokinin (BAP) sehingga sel-sel melakukan proliferasi membentuk struktur bakal organ berupa kumpulan sel-sel yang akan mengalami diferensiasi. Menurut Zulkarnain (2009) bahwa jaringan-jaringan yang sedang aktif tumbuh pada awal masa per-

tumbuhan biasanya merupakan bahan eksplan yang paling baik.

Pada induksi kalus ini, mengombinasikan penggunaan hormon auksin dan sitokinin dapat memberikan pengaruh yang baik terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan bahan metabolit sekunder. Kalus yang bersifat embriogenik yang dihasilkan dari kombinasi hormon auksin dan sitokinin akan memberikan pengaruh pada produksi bahan metabolit sekunder (Bienaime *et al.* 2015).

Faktor lain yang mendukung keberhasilan persentase tumbuh eksplan pada penelitian ini adalah karena penggunaan media MS yang mengandung komposisi lengkap untuk pertumbuhan eksplan. Pemberian hormon dengan beberapa konsentrasi pada media MS memberikan persentase tumbuh eksplan yang baik, karena pada media mengandung vitamin, unsur hara makro dan mikro, serta besi dan sukrosa sehingga cukup untuk memacu pertumbuhan eksplan dalam pembentukan kalus (Ardiana 2009). Pertumbuhan organ vegetatif dipengaruhi oleh aktivitas auksin dan nitrogen dalam media, dan sumber nitrogen organik paling tinggi terdapat pada media MS dibandingkan dengan media lainnya. Hal inilah yang mendukung khususnya pada perlakuan kombinasi hormon 2,4-D dan BAP.

Lebar Kalus

Hasil analisis varian untuk parameter lebar kalus yang terbentuk menunjukkan perbedaan nyata. Kombinasi perlakuan dengan lebar kalus tertinggi terdapat pada perlakuan D_4B_2 dengan lebar kalus 0,97 cm (Tabel 1), hal ini disebabkan karena perbedaan konsentrasi hormon auksin dan sitokinin yang diberikan. Menurut Mahadi *et al.* (2014), salah satu peranan hormon 2,4-D adalah membantu dalam proses pembelahan dan pemanjangan sel. Penggunaan batang muda yang mengandung sel-sel meristematik mempercepat pembelahan sel baru sehingga semakin tinggi kandungan hormon 2,4-D maka akan semakin cepat terjadi proliferasi sel sehingga akan membentuk kalus. Kalus yang terbentuk adalah kumpulan sel-sel muda yang mudah terurai bersifat remah, hal inilah yang disebut kalus embriogenik.

Faktor lain yang juga memengaruhi pembelahan sel-sel kalus adalah sumber karbon yang terdapat pada media MS, yaitu berupa sukrosa. Karbon merupakan komponen penting bagi senyawa-senyawa penyusun sel seperti karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat. Jika sumber karbon mencukupi maka komponen-komponen sel ini akan terbentuk cepat, waktu inisiasi kalus pun akan lebih cepat sehingga sel akan mempunyai kesempatan untuk membelah lebih optimal (Ardiana 2009). Pembelahan sel yang optimal akan menyebabkan pertumbuhan kalus yang optimal. Dengan demikian, semakin cepat sel-sel dalam memanfaatkan hormon pertumbuhan, maka semakin cepat pula terjadi peningkatan jumlah sel-sel tersebut, hal ini akan menambah lebar kalus terutama pada

perlakuan D_4B_2 (Gambar 1). Pertumbuhan kalus dapat mengarah ke pembentukan tunas *adventitious* jika perlakuan mengarah pada tingginya konsentrasi sitokinin berbanding auksin dan ini dapat membentuk pucuk (Balilashaki *et al.* 2015).

Tekstur Kalus

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu: kompak (*non friable*), intermediet, dan remah (*friable*). Berdasarkan hasil pengamatan, dilihat dari Tabel 2 tekstur kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan umumnya adalah bertekstur remah dan dengan warna yang bervariasi seperti terlihat pada Gambar 2.

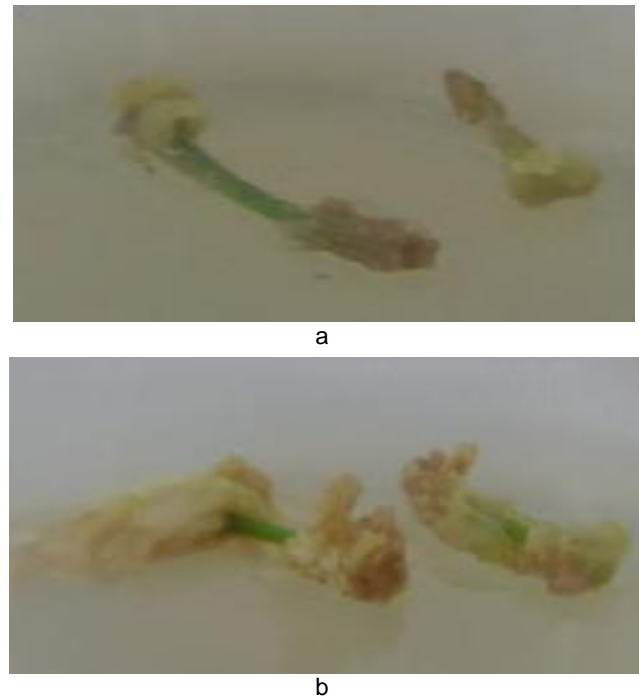
Kalus dengan tekstur remah dihasilkan pada perlakuan D_1B_0 , $D_1B_{0,5}$, D_1B_1 , D_1B_2 , D_2B_0 , D_2B_1 , D_2B_2 , dan D_3B_0 , dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang telah tumbuh membentuk kalus tersebut. Tekstur kalus yang remah (*friable*) mengalami pembelahan sel yang cepat daripada tekstur kalus yang kompak. Tekstur kompak disebabkan karena kalus mengalami pembentukan lignifikasi sehingga kalus tersebut mempunyai tekstur yang keras yang merupakan efek dari sitokinin yang berperan dalam transport zat hara. Pada perlakuan D_2B_1 , D_2B_2 , dan D_3B_0 menghasilkan tekstur kalus yang remah berwarna putih kekuningan dan bersifat embriogenik. Hal ini sangat sesuai untuk dijadikan kultur suspensi sel untuk memproduksi bahan metabolit sekunder.

Warna pigmen putih dan kuning pada kalus menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus tersebut baik. Warna hijau disebabkan kalus mengandung klorofil, akibat interaksi 2,4-D dan BAP (sitokinin) yang berperan dalam pembentukan klorofil pada kalus. Menurut Wardani *et al.* (2004), perubahan warna kalus menjadi putih kehijauan, pada sel kalus sudah mulai terbentuk klorofil sebagai reaksi pencahayaan sehingga kloroplas melakukan fotosintesis.

Pertumbuhan kalus semakin menurun pada minggu ke-7 yang diawali dengan gejala perubahan warna menjadi cokelat (*browning*), hal ini diduga karena sel mengalami degradasi fisiologis akibat kekurangan unsur hara atau hormon tumbuhnya sehingga kalus menunjukkan ciri ketuaan. Menurut Yusnita (2003), warna kecokelatan pada kalus ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat toksik, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan, yang menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan. Kalus yang bersifat embriogenik yang dihasilkan dari kombinasi hormon auksin dan sitokinin akan memberikan pengaruh pada produksi bahan metabolit sekunder.

Kalus Embriogenik yang Terbaik

Kalus merupakan bahan awal untuk pembuatan kultur suspensi sel, untuk tujuan produksi metabolit sekunder, metode kultur suspensi sel merupakan metode pilihan sampai saat ini. Agar kalus dapat

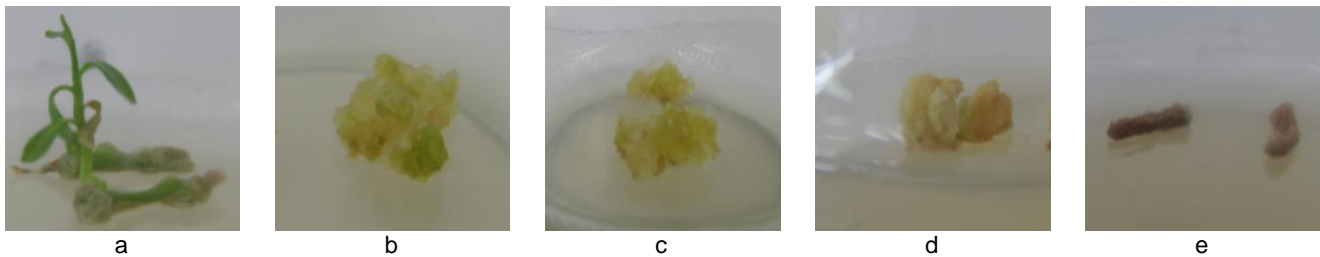


Gambar 1 Lebar kalus yang tumbuh pada perlakuan (a) D_0B_2 diameter 0,3 cm dan (b) D_4B_2 .

Tabel 2 Tektur kalus jeruk kasturi

Kombinasi 2,4-D dan BAP (mg/l)	Tekstur kalus
D_0B_0	Kompak, berwarna hijau
$D_0B_{0,5}$	Kompak, berwarna hijau
D_0B_1	Kompak, berwarna hijau
D_0B_2	Kompak, berwarna hijau
D_1B_0	Remah, berwarna putih kehijauan
$D_1B_{0,5}$	Remah, berwarna putih kehijauan
D_1B_1	Remah, berwarna putih kehijauan
D_1B_2	Remah, berwarna putih kehijauan
D_2B_0	Remah, berwarna putih kehijauan
$D_2B_{0,5}$	Remah, berwarna putih kehijauan
D_2B_1	Remah, berwarna putih kekuningan
D_2B_2	Remah, berwarna putih kekuningan
D_3B_0	Remah, berwarna putih kekuningan
$D_3B_{0,5}$	Kompak, berwarna kuning
D_3B_1	Kompak, berwarna kuning
D_3B_2	Kompak, berwarna kuning
D_4B_0	Kompak, berwarna cokelat
$D_4B_{0,5}$	Kompak, berwarna cokelat
D_4B_1	Kompak, berwarna cokelat
D_4B_2	Kompak, berwarna cokelat

digunakan sebagai bahan awal suspensi adalah sel kalus yang embriogenik mempunyai ciri-ciri tekstur kalus remah dan mudah terurai, warna kalus putih hingga kuning, tidak mudah terjadi oksidasi zat fenolik, dan sel-selnya mudah berkembang biak (Mahadi 2012). Sedangkan kalus yang non embriogenik berwarna kuning kecokelatan, agak pucat, dan lembek berair sehingga sulit dipisahkan (Peterson & Smith 1991). Dalam hal ini, kalus yang berstruktur kompak diindikasikan sebagai kalus yang tidak embriogenik (*non friable*). Untuk mendapatkan kalus yang embriogenik, kita dapat melakukan subkultur

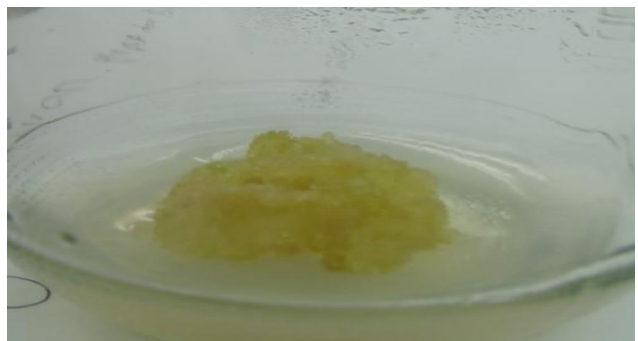


Gambar 2 Tekstur kalus yang terbentuk pada berbagai perlakuan: a) Hijau padat dan tumbuh *plantlet*; b) Putih kehijauan remah; c) Putih kekuningan remah (*embryogenic*); d) Kuning kompak; dan e) Cokelat kompak.

secara berulang sehingga akan didapat kalus yang memiliki struktur yang lebih remah. Pada umumnya kalus remah dapat dihasilkan secara langsung dari berbagai jenis tanaman dan tipe eksplan, upaya untuk mendapatkan kalus remah dilakukan dengan meningkatkan konsentrasi 2,4-D hingga 4 mg/l dan dikombinasikan dengan BAP (0,5; 1; dan 2,0 mg/l). Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan 2,4-D menjadi 2 mg/l dan dikombinasikan dengan BAP (0,5–2 mg/l) memberikan respons yang paling baik terhadap kalus yang dikulturkan terutama pada perlakuan D₂B₁. Tabel 2, memperlihatkan persentase kalus remah yang dihasilkan dari semua perlakuan yang diuji, yaitu mencapai 45%. perlakuan kombinasi 2 mg/l 2,4-D dikombinasikan dengan BAP (1 & 2 mg/l) menghasilkan kalus remah dengan visual yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Kalus yang dihasilkan dari perlakuan ini sangat remah dan mudah dipisahkan dan kandungan airnya sedikit (Gambar 3).

Penambahan 2,4-D dalam media ternyata efektif untuk meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan semakin meningkatkan laju pertumbuhan kalus. Auksin berupa 2,4-D dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas, dan pengembangan dinding sel (Abidin 1982). Menurut Wardani *et al.* (2004) plastisitas dan pengembangan dinding sel didorong oleh pemberian auksin, karena auksin mengeluarkan H⁺ ke dalam dinding sel dan H⁺ ini menyebabkan pH dinding sel menurun sehingga terjadi pelonggaran struktur dinding (berarti peningkatan plastisitas) dan terjadi pertumbuhan. Pelonggaran dinding sel terjadi karena pH yang rendah mengaktifkan enzim yang mematahkan ikatan-ikatan antara polisakarida pembatas pada dinding sel kemudian sel akan tumbuh lebih cepat karena adanya kenaikan tekanan turgor (Govinden-Soulange *et al.* 2009).

Selain itu kalus yang dihasilkan berwarna putih kekuningan dan dalam pertumbuhannya kalus tersebut memperlihatkan perubahan warna menjadi kuning muda, hal ini sesuai dengan pernyataan Mahadi *et al.* (2014) warna kalus dapat memperlihatkan baik tidaknya pertumbuhan kalus, pigmen putih, dan kuning pada kalus menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus tersebut baik.



Gambar 3 Kalus yang memiliki tekstur remah (*friable*) pada perlakuan D₂B₁ setelah subkultur.

Kalus dapat digunakan sebagai bahan awal kultur suspensi adalah sel kalus yang embriogenik mempunyai ciri-ciri tekstur kalus remah dan mudah terurai, warna kalus putih kekuningan, tidak mudah terjadi oksidasi zat fenolik, dan sel-selnya mudah berkembang biak (Mahadi 2012). Struktur kalus remah sangat berkorelasi dengan kecepatan daya tumbuh kalus sehingga produksi metabolit sekunder tertentu yang ingin diperoleh lebih cepat dicapai. Untuk mendapatkan kalus yang embriogenik, kita dapat melakukan subkultur secara berulang sehingga akan didapat kalus yang memiliki struktur yang lebih remah (Kristina 2008). Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan 2 mg/l 2,4-D dikombinasikan dengan BAP (1 & 2 mg/l) menghasilkan kalus remah dengan visual yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kombinasi 2,4-D dan BAP berpengaruh nyata terhadap pembentukan (induksi) dan pertumbuhan kalus pada kultur jaringan jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*). Kalus yang berwarna putih kekuningan, mengkilat, dan remah merupakan ciri kalus embriogenik yang dihasilkan pada perlakuan D₂B₁ dan D₂B₂. Namun, disarankan untuk penelitian lanjutan kepada kajian kultur suspensi sel sebaiknya menggunakan perlakuan D₂B₁ (2 mg/l 2,4-D dan 1 mg/l BAP) karena kalus yang dihasilkan adalah kalus embriogenik yang sesuai untuk kultur suspensi sel, sehingga diharapkan dapat menghasilkan bahan metabolit sekunder.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin Z. 1982. *Dasar-dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung (ID): Angkasa.
- Ardiana DW. 2009. Teknik Pemberian Benzyl Amino Purin untuk Memacu Pertumbuhan Kalus dan Tunas pada Kotiledon Melon (*Cucumis melo* L.). *Buletin Teknik Pertanian*. 14(2): 50–53.
- Balilashaki K, Vahedi M, Karimi R. 2015. In vitro direct regeneration from node and leaf explant of *Phalaenopsis* cv. Surabaya. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*. 25(2): 193–205. <http://doi.org/bpqd>
- Bal JS. 1997. *Fruit Growing*. New Delhi (IN): Kalyani Publishers.
- Bienaime C, Melin A, Bensaddek L, Attoumbre J, Nava-Saucedo E, Baltora-Rosset S. 2015. Effects of plant growth regulators on cell cultures of *Lycopodiella inundata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 123(3): 523–533. <http://doi.org/bpqf>
- Govinden-Soulange J, Boodia N, Dussooa C, Gunowa R, Deensah S, Facknath S, Rajkomar B. 2009. Vegetative Propagation and Tissue Culture of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle). *World Journal of Agricultural Sciences*. 5(5): 651–661.
- Gunawan LW. 1992. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Bogor (ID): Pusat Antar Universitas. Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Hartman HT, Kester DE. 1983. *Plant Propagation Principles and Practice*. New Jersey (US): Prentice Hall, Inc.
- Mahadi I. 2012. Induksi Kalus Kenerak (*Goniothalamus umbrosus*) berdasarkan jenis eksplan menggunakan metode In Vitro. *Jurnal Agroteknologi Tropika*. 1(1): 18–22.
- Mahadi I, Wulandari S, Omar A. 2014. Pengaruh Naftalen Acetyl Acid (NAA) dan Benzyl Amino Purin (BAP) Terhadap Pembentukan Kalus Tanaman Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) sebagai Sumber Belajar Konsep Bioteknologi Bagi Siswa SMA. *Jurnal Biogenesis*. 11(1): 1–7.
- Kristina NN. 2008. Multiplikasi Tunas dan aklimatisasi Pegagan (*Centella asiatica*) periode kultur lima tahun. *Jurnal Littri*. 14(1): 30–35.
- Peterson G, Smith R. 1991. Effect of abscisic acid and callus size on regeneration of American and international rice varieties. *Plant Cell Reports*. 10(1): 35–38. <http://doi.org/fr6ng9>
- Rahmi I, Suliansyah I, Bustamam T. 2010. Pengaruh Pemberian Beberapa Konsentrasi BAP dan NAA Terhadap Multiplikasi Tunas Pucuk Jeruk Kanci (*Citrus* sp.) Secara In Vitro. *Jerami*. 3(3): 210–219.
- Robles-Martinez M, Barba-de la Rosa AP, Gueroud F, Negre-Salvayre A, Rossognol M, Santos-Diaz MS. 2016. Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* Species: Study on their potential as a source of metabolite production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 124(1): 181–189. <http://doi.org/bpqg>
- Samudin S. 2009. Pengaruh Kombinasi Auksin-Sitokinin Terhadap Pertumbuhan Buah Naga. *Media Litbang Sulteng*. 2(1): 62–66.
- Wardani DP, Solichatun, Setyawan AD. 2004. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum Gaertn* Pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Biofarmasi*. 2(1): 35–43.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan Cara memperbanyak Tanaman secara Efisien*. Jakarta (ID): Agromedia Pustaka.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman Solusi Perbanyak Tanaman Budi daya*. Jakarta (ID): Bumi Aksara.